



顺乌头酸酶 (Aconitase) 活性测定试剂盒

紫外分光光度法

货号: R45028-48S

产品简介:

顺乌头酸酶(Aconitase, EC 4.2.1.3), 三羧酸循环中的酶, 催化柠檬酸转变为异柠檬酸。柠檬酸本身不易氧化, 在顺乌头酸酶作用下, 通过脱水与加水反应, 使羟基由 β 碳原子转移到 α 碳原子上, 生成易于脱氢氧化化的异柠檬酸, 为进一步的氧化脱羧反应作准备。

顺乌头酸酶(Aconitase) 催化柠檬酸转化成异柠檬酸, 异柠檬酸在异柠檬酸脱氢酶的作用下氧化脱羧将NADP⁺还原生成NADPH, 通过检测NADPH 在340nm 处光吸收的增加速率, 即可得出顺乌头酸酶活性大小。

试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体60mL×1瓶	-20℃ 保存	
试剂二	液体15mL×1瓶	-20℃ 保存	
试剂三	液体0.5mL×1瓶	-20℃ 保存	
试剂四	液体35mL×1瓶	4℃ 保存	
试剂五	A: 粉体mg×1支 B: 粉体mg×1支	4℃ 保存	临用前分别加0.25mL蒸馏水于A和B中, 使其完全溶解, 4℃ 保存一个月。
试剂六	液体 μ L×1支	-20℃ 保存	临用前甩几下使液体落入底部, 再加 0.95mL蒸馏水混匀, 可分装保存。
试剂七	粉体mg×1瓶	4℃ 保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 再加 34mL试剂四溶解, 4℃ 保存。
试剂八	粉体mg×1支	4℃ 保存	临用前甩几下使粉体落入底部, 再加 1.1mL蒸馏水溶解, 4℃ 保存。

所需的仪器和用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿(光径1cm)、 可调式移液器、低温离心机、研钵。



顺乌头酸酶活性测定:

1、线粒体制备(提示: 整个线粒体的提取过程须保持4℃低温环境):

①称取约0.1g 组织或收集500万细胞, 加入1mL 试剂一, 用冰浴匀浆器或研钵匀浆, 转移至离心管后于4℃×700g 离心10min。

②弃沉淀, 上清液移至另一离心管中, 4℃×12000g 离心10min。上清液即胞浆提取物, 可用于测定胞浆中的顺乌头酸酶 (此步可选做), 沉淀为线粒体。

③在沉淀(线粒体)中加入200 μL 试剂二和2μL 试剂三, 超声波破碎(冰浴, 功率20%或 200W, 超声3s, 间隔10秒, 重复30次), 液体置冰上用于线粒体中顺乌头酸酶测定。

【注】:若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积(mL)为1:5~10的比例进行提取, 或按照细胞数量(10^4):提取液 (mL) 为500~1000:1的比例进行提取。

2、试剂A与B以1:1比例混匀制备成激活剂(现配现用), 取③步中得到的液体100μL至新 EP管中, 加入5μL的激活剂, 置于冰上孵育1小时, 若浑浊则4℃×12000g离心5min后取上清液作为样本直接检测。

3、上机检测:

①紫外分光光度计预热30min以上, 调节波长至340nm, 蒸馏水调零。

②所有试剂解冻至室温(25℃)。

③在 1mL 石英比色皿(光径1cm) 中依次加入:

试剂名称(μL)	测定管
样本	60
试剂六	20
试剂七	640
混匀, 37℃条件下, 孵育5min	
试剂八	20
混匀, 37℃条件下, 立即于340nm处读取A1, 3min后读取A2, $\Delta A = A2 - A1$ 。	

结果计算:

1、按样本蛋白浓度计算:



酶活定义: 在37℃下, 每毫克组织蛋白每分钟产生1nmol NADPH为一个酶活单位。

$$\text{顺乌头酸酶}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot})=[\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T \\ = 661 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按样本鲜重计算:

酶活定义: 在37℃下, 每克组织每分钟产生1nmol NADPH为一个酶活单位。

$$\text{顺乌头酸酶}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重})=[\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_1 \div V) \div T \\ = 140.1 \times \Delta A \div W$$

3、按细菌/细胞密度计算:

酶活定义: 在37℃下, 每1万个细菌/细胞每分钟产生1nmol NADPH为一个酶活单位。

$$\text{顺乌头酸酶}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell})=[\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_1 \div V) \div T \\ = 0.28 \times \Delta A$$

V1---加入样本体积, 0.06mL;

V---加入提取液体积, 0.212 mL;

V2--- 反应体系总体积, 7.4×10^{-4} L;

d--- 光径, 1cm;

T---反应时间, 3min;

W---样本质量, g;

ϵ ---NADPH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L}/\text{mol}/\text{cm}$;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL, 建议使用本公司的BCA蛋白含量检测试剂盒。